



## Determinação das Características Físico-químicas da Atividade $\beta$ -glucosidase presente no Complexo Enzimático de *Aspergillus versicolor*

Jéssica Batista de Oliveira<sup>1</sup>, Carlos Gustavo Nunes-Silva<sup>2</sup>, Pamella Suely Santa-Rosa<sup>3\*</sup>.

### Resumo

Os fungos filamentosos possuem grande potencial para produção de enzimas de interesse industrial, e neste contexto a enzima  $\beta$ -glucosidase desperta a atenção, devido a sua importância biotecnológica, por serem aplicadas nos mais variados setores industriais, e principalmente por desempenhar papel fundamental nos processos de conversão final da biomassa celulósica à glicose. Diante desse cenário, neste estudo foi avaliada a produção da enzima  $\beta$ -glucosidase por uma estirpe de fungo filamentoso isolado da região amazônica identificado como *Aspergillus versicolor*, e realizada a caracterização da atividade da enzima quanto aos seus parâmetros físico-químicos. Nós verificamos que *Aspergillus versicolor* tem sua temperatura máxima de produção de  $\beta$ -glucosidases em 120h de cultivo submerso. Atuando em uma faixa de pH intermediária entre a ácida e a neutra, tendo as mais altas atividades enzimáticas nos pH's 5.0, 5.4 e 6.0. A Temperatura ótima da enzima foi de 60°C combinada com pH 6.0, podendo também atuar em 70 e 50°, sendo estável em 50° por mais de 1 hora de incubação, e por cerca de 30 minutos em 60°C, e 15 minutos em 70°C. Os valores das constantes catalíticas da enzima foram:  $K_m = 15,62\mu\text{M}$  e  $V_{m\acute{a}x} = 0,448\mu\text{M}$ . Os dados obtidos nesse estudo são interessantes pois indicam as principais características e o potencial da enzima produzida por esta estirpe para aplicação em bioprocessos industriais.

**Palavras-Chave:**  $\beta$ -glucosidase, Caracterização enzimática, *Aspergillus versicolor*.

**Determination of the Physical-Chemical Characteristics of the Activity  $\beta$ -glucosidase present in the *Aspergillus versicolor* Enzymatic Complex.** The Filamentous fungi have great potential for the production of enzymes of industrial interest, and in this context the enzyme  $\beta$ -glucosidase arouses the attention, due to its biotechnological importance, since this enzyme can to be applied in the most varied sectors of industrial, and especially for his performance in their the processes of final conversion of cellulosic biomass to glucose. In this study, the production of the enzyme  $\beta$ -glucosidase by a strain of filamentous fungus isolated in the Amazon region and identified as *Aspergillus versicolor* was evaluated, and the enzyme activity characterization was performed for its physicochemical parameters. We have verified that the fungi *Aspergillus versicolor* has its maximum production temperature of  $\beta$ -glucosidases in 120h of submerged culture. The enzyme acts in an intermediate pH range between acid and neutral, having the highest enzymatic activities at pHs 5.0, 5.4 and 6.0. The optimum temperature of the enzyme was 60 ° C combined with pH 6.0, and it could also act in 70 and 50 °, being stable at 50 ° for more than 1 hour of incubation, and for about 30 minutes at 60 ° C, and 15 minutes at 70 ° C. The values of the catalytic constants of the enzyme were:  $K_m = 15.62\mu\text{M}$  and  $V_{max} = 0.448\mu\text{M}$ . The data obtained in this study are interesting because they indicate the main characteristics and the potential of the enzyme produced by this strain for application in industrial bioprocesses.

**Key-words:**  $\beta$ -glucosidase, Enzymatic characterization, *Aspergillus versicolor*

<sup>1</sup>Graduanda em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Av. General Rodrigo Otávio 1200, Coroado 1, 69067-005, Manaus, Amazonas, Brasil. [jessicabatista115@gmail.com](mailto:jessicabatista115@gmail.com).

<sup>2</sup>Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas. Av. General Rodrigo Otávio 1200, Coroado 1, 69067-005, Manaus, Amazonas, Brasil. [cgmanaus@gmail.com](mailto:cgmanaus@gmail.com).

<sup>3</sup>Doutoranda em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-PPGBIOTEC. Universidade Federal do Amazonas. Av. General Rodrigo Otávio 1200, Coroado 1, 69067-005, Manaus, Amazonas, Brasil. [pamellasuely@gmail.com](mailto:pamellasuely@gmail.com). \*Autor Correspondente.



## 1. Introdução

As enzimas de origem microbiana possuem uma vasta aplicação industrial nos mais variados bioprocessos. As enzimas microbianas são conhecidas como enzimas superiores àquelas obtidas a partir de outras fontes (animais, por exemplo), devido à facilidade de produção e recuperação dessas enzimas, particularmente para aplicações em indústrias que requerem baixo custo e rapidez no processo (NIGAM, 2013).

A enzima  $\beta$ -glucosidase é alvo de grande interesse industrial, por exemplo, na indústria alimentícia elas são empregadas para realçar o sabor de alimentos e bebidas, além de possuírem a capacidade de liberar vitaminas, antioxidantes e outras biomoléculas, possibilitando um maior aproveitamento dos alimentos (DOUGHERTY et al., 2012). Na atualidade, as enzimas  $\beta$ -glucosidases tem atraído considerável atenção devido ao seu papel importante na biotecnologia de produção de etanol combustível a partir de resíduos agrícolas (SINGHANIA et al., 2013).

A principal reação que as  $\beta$ -glucosidases catalisam é a hidrólise de ligações  $\beta$ -glicosídicas em glicosídeos de baixa massa molecular (COULON, 1998). Estas enzimas clivam ligações do tipo  $\beta$ -1-4 de substratos solúveis como celobiose, celodextrinas e outros oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) além também de substratos cromogênicos, como p-nitrophenyl (XU et al., 2007; LYND, 2002; ZHANG et al., 2009).

No contexto de aplicação de  $\beta$ -glucosidases na produção de etanol de segunda geração, essas enzimas agem em conjunto com celulasas (enzimas que desconstruem a fibra de celulose presente na biomassa vegetal. Os polímeros da celulose são degradados em glicose através de ações sinérgicas dessas enzimas, onde as Endoglucanases (primeiras celulasas a agirem na fibra) clivam a região amorfa da cadeia de celulose, liberando cadeias menores, ou seja, oligossacarídeos de diversos tamanhos com terminais redutores e não redutores que servem de substrato para a próxima enzima do complexo celulolítico, as Exoglucanases que atuam nessas regiões terminais das cadeias, clivando-as, e liberando oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas), celodextrinas e dímeros de glicose como a celobiose, e sobre

essas moléculas menores a  $\beta$ -glucosidase atua, clivando-as e liberando monômeros glicose (TOLAN, 2002; LYND et al., 2002; DEVAUX, 2005).

As  $\beta$ -glucosidases são produzidas por microorganismos de diferentes espécies, sendo que fungos do gênero *Aspergillus* são conhecidos pela eficiente produção desta enzima.  $\beta$ -glucosidases de *Aspergillus* tem sido utilizadas para suplementar misturas enzimáticas que não apresentam atividade eficiente desta enzima, como os extratos enzimáticos de fungos do gênero *Trichoderma* (WARD et al., 2006; AHAMED et al., 2008). De modo geral,  $\beta$ -glucosidases de fungos são preferidas em relação as de bactérias devido a sua capacidade de produzirem alta atividade enzimática, o desempenho dos fungos na produção e secreção de enzimas complexas pode ser devido ao seu sistema de secreção eficiente, não encontrado em bactérias, o que as torna difíceis ou inviáveis para serem projetadas para produção destas enzimas em grandes quantidades (AMOREA; FARACO, 2012).

A viabilidade da aplicação de  $\beta$ -glucosidases está relacionada com alta eficiência de conversão a baixos custos de produção, neste sentido as características desejáveis para que a enzima seja considerada viável comercialmente são: a capacidade de atuação em pH e temperatura requeridas nos processos em que serão utilizadas, possuir baixa inibição pelo produto e componentes do processo e ter estabilidade térmica (BUSTO et al., 1995; CASTRO, 2010; SHI et al., 2011). Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar a atividade  $\beta$ -glucosidase no complexo enzimático de uma estirpe de *A. versicolor*, isolado na região amazônica, quanto aos parâmetros físico-químicos, pH, temperatura, estabilidade térmica, efeitos de íons metais na atividade enzimática e ainda determinar os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, como constante de Michaelis ( $K_m$ ) e velocidade máxima ( $V_{máx.}$ ) da enzima.

## 2. Material e Método

### 2.1 Micro-organismo

O fungo filamentosso utilizado neste estudo foi previamente isolado de material vegetal processado em uma biorefinaria do município de Presidente Figueiredo no estado do Amazonas



**PIBIT/2016-2017 – Universidade Federal do Amazonas**

(latitude 01° 96' 04"S e longitude 60° 14' 37" W), e identificado como *Aspergillus versicolor*, por Carvalho (2009). O mesmo encontrava-se preservado em frascos com água destilada esterilizada, conforme o método de Castellani (1939) no Laboratório de Microbiologia Industrial do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas. A partir das amostras preservadas, o fungo foi reativado. Os esporos foram inoculados em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA) e incubados a 30°C por sete dias para crescimento. Após crescimento a cultura foi repicada para o meio BDA em tubo inclinado onde ficou crescendo até esporulação, aproximadamente 12 dias.

## 2.2 Padronização do Inóculo

Após esporulação em meio BDA em tubos inclinados era preparada uma suspensão de esporos com água destilada esterilizada de onde se retirava uma alíquota e realizava-se a contagem de esporos em câmara de Neubauer conforme metodologia de Alfenas e Mafia (2007). Esse procedimento foi feito para o preparo dos pré-inóculos.

## 2.3 Meio de Cultivo Submerso

O meio de cultivo utilizado foi o meio líquido de Mandels (MANDELS e WEBER 1969), composto de:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,0g/L),  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,5g/L),  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1,4g/L), Ureia (0,3g/L), Peptona (1,0g/L), Extrato de levedura (0,25g/L),  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5mg/L),  $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,6mg/L),  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,4mg/L),  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , suplementado com a fonte de carbono: glicose 1% massa/volume (m/v) no caso de pré-inóculo, ou com 1% (m/v) de celulose microcristalina (Avicel), para produção de enzima.

## 2.4 Produção de $\beta$ -glucosidase por *Aspergillus versicolor* em cultivo submerso

Para análise do perfil cinético de produção enzimática em relação ao tempo, o pré-inóculo foi preparado com meio Mandels (glicose 1%) e inoculado com 5 % de solução de esporos na concentração de  $242,75 \times 10^6$  e incubado em uma incubadora de agitação orbital (Shaker) a 30°C, 200rpm por 72h para crescimento micelial. Após esse período, 5mL desse cultivo foi transferido

para frascos erlenmeyers contendo 100mL de meio Mandels (Avicel 1%), foram preparados 5 frascos a partir do mesmo pré-inóculo, e a cada 24 horas retirava-se um frasco para análise, o período total de retirada foi de 120 horas. O cultivo de cada frasco foi centrifugado imediatamente após a retirada, em centrifuga 5810 R, Eppendorf, por 10 min a  $4,000 \times g$  e 4°C para remoção de células, o sobrenadante foi estocado a 4°C para análises posteriores.

Para a caracterização da enzima, realizou-se uma indução direta no tempo onde se obteve a mais alta atividade, previamente determinado na cinética de produção. Ajustando a concentração da solução de esporos e o volume inoculado para 10% (v/v). Assim, o pré-inóculo, foi feito com 10mL de suspensão de esporos na concentração de  $1,313 \times 10^6$  em 100mL de meio Mandels com glicose 1%, incubado a 30°C sob a agitação constante de 200rpm, por 72h. Após esse período, 10% do pré-inóculo contendo o crescimento celular foi transferido para outros frascos de 500mL contendo 100mL de meio Mandels com 1% de fonte de carbono celulósica (Avicel). Os frascos, em triplicata, foram incubados a 30°C a 200rpm. Após o tempo de cultivo, os sobrenadantes foram centrifugados para remoção de micélio, e o extrato enzimático bruto (sobrenadante de cultivo sem micélio) foi estocado a 4°C para as análises posteriores.

## 2.5 Determinação da atividade $\beta$ -glucosidase

A atividade  $\beta$ -glucosidásica foi quantificada seguindo-se a metodologia descrita por Ghose (1987), e a glicose liberada na reação da enzima sobre o substrato foi quantificada utilizando-se um kit comercial baseado na reação da glicose oxidase (GOD). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas de reação.

Para a reação, foi usado como substrato da enzima uma solução de celobiose a 2% dissolvida em tampão citrato 50mM, pH 5.0. O extrato enzimático foi previamente diluído na proporção 1:1 com tampão citrato nas mesmas condições. Os ensaios foram realizados em microtubos tipo eppendorf de 2mL, a solução de reação foi composta por 50 $\mu$ L de celobiose 2% e 50 $\mu$ L de extrato enzimático diluído. Os controles foram feitos da seguinte maneira: o controle da enzima (CE) foi composto por 50 $\mu$ L de extrato



PIBIT/2016-2017 – Universidade Federal do Amazonas

enzimático diluído e 50µL de tampão, e o controle do substrato (CS) possuía 50µL de celobiose e 50µL de tampão. O branco (Zero) reacional era composto por 100µL de água destilada. Depois de agitar em vórtex os tubos foram incubados por 15min a 50°C em banho-maria, decorrido o tempo de reação, as amostras foram resfriadas em banho gelado e em seguida aos tubos foi adicionado 1mL do reagente GOD e incubado por mais 15min na temperatura de 37°C, decorrido esse tempo foi adicionado 910µL de água destilada e então foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 505nm, onde o branco reacional foi utilizado para zerar o equipamento.

A glicose liberada na reação foi quantificada por intermédio do fator de calibração (FC) da glicose padrão presente no kit GOD, com a relação:

$$\text{Glicose liberada (mg/mL)} = \text{FC} * \text{Absorbância da amostra.}$$

Onde o fator de calibração foi determinado pela seguinte relação:

$$\text{FC} = \text{CP/AB}$$

Onde, CP: concentração do padrão e AB: absorbância do padrão (triplicata). Após quantificar a glicose liberada, a atividade de β-glucosidase em U/mL foi calculada utilizando-se a equação padrão para unidade de atividade, onde, uma unidade de atividade corresponde a 1µmol de produto liberado por mL por minuto, conforme a equação:

$$\text{Atividade} \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{Gli \times 10^3}{180} \times \frac{1}{t} \times \frac{vt}{ve} \times fd$$

Sendo: Gli = Concentração de glicose (mg/mL); 10<sup>3</sup>= fator de transformação de mg/mL para µg/mL; 180 = fator de transformação de µg para µmol, de acordo com a massa molar da glicose. t = tempo de reação (min); vt = volume do meio reacional; ve = volume de enzima utilizada no ensaio; fd = fator de diluição;

## 2.6 Determinação do pH ótimo

Para determinação do pH ótimo da atividade β-glucosidásica foi utilizado o tampão Citrato/Fosfato (McIlvaine), com variação do pH de: 2.6 – 3.0 – 3.6 – 4.2 – 4.6 – 5.0 – 5.4 – 6.0 – 7.0 – 8.0. Onde para obtermos a solução nessas faixas de pH's foi preparado uma solução estoque

de fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,2M e outra solução estoque de ácido cítrico 0,1M, estas soluções foram misturadas nas proporções mostradas na tabela 1, para que se obter um volume final de 20mL. Após a mistura e homogeneização, foi feita a medição do pH utilizando um pHmetro para avaliar se a solução final encontrava-se com o valor de pH desejado. Nas soluções em que o pH não atingiu o valor desejado foram feitos ajustes utilizando o NaOH (hidróxido de sódio) ou HCL (ácido clorídrico). O extrato enzimático previamente diluído na proporção 1:1 com o tampão McIlvaine nos diferentes pH's foi incubado para reação enzimática, conforme metodologia descrita no item 2.6. A faixa de pH's onde se obteve maiores atividades em U/mL foi determinado como a faixa ótima.

Tabela 1- Combinação de volumes para obtenção de tampão citrato/fosfato McILVAINE. (1921).

Faixa de pH	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2M (mL)	Ácido cítrico 0,1M (mL)
2.6	2,18	17,82
3.0	4,11	15,89
3.6	5,70	14,30
4.2	8,28	11,72
4.6	9,35	10,65
5.0	10,30	9,70
5.4	11,15	8,85
6.0	12,63	7,37
7.0	16,47	3,53
8.0	19,45	0,55

## 2.6 Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica

Para se determinar a temperatura ótima da atividade β-glucosidase as reações enzimáticas foram realizadas diluindo-se o extrato enzimático com tampão McILVAINE, na faixa de pH ótimo estabelecida, e adicionando o substrato celobiose 2% (preparado nas mesmas faixas de pH's com o mesmo tampão) e incubando as amostras reacionais em diferentes temperaturas de 20° a 80°C. Após análise das atividades enzimáticas em cada temperatura, foram selecionadas as

PIBIT/2016-2017 – Universidade Federal do Amazonas

temperaturas onde a atividade em U/mL foi mais alta.

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada pré-incubando o extrato enzimático (diluído com tampão McILVAINE na faixa de pH ótima) por 120 minutos nas temperaturas ótimas estabelecidas, e a cada 15 minutos retirava-se uma alíquota para avaliar a atividade enzimática. Os testes de atividade enzimática seguiram a metodologia de dosagem descrita no item 2.6.

### 2.7 Efeito de íons metais na atividade $\beta$ -glucosidase

Para determinação do efeito de íons metálicos sobre a atividade  $\beta$ -glucosidase, os ensaios enzimáticos foram realizados com a adição de íons na concentração de 0,02M a mistura da reação (GOMATHI, 2012), o ensaio foi realizado nas nas condições ótimas estabelecidas (pH e temperatura). Os íons utilizados foram: NaCl, CaCl, MgCl, CuSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub>.

### 2.8 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{máx}$

Para que a realização dos ensaios enzimáticos de avaliação dos parâmetros cinéticos, fossem feitos com uma maior precisão catalítica, o extrato enzimático foi concentrado 10 vezes utilizando uma coluna Vivaspín de 3kDa, conforme instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados nas condições ótimas estabelecidas variando-se a concentração do substrato (celobiose) de 6 a 30mM. A atividade enzimática (U/ml) foi determinada em cada concentração de substrato. O  $V_{máx}$  (velocidade máxima) e o  $K_m$  (constante de Michaelis – Menten) foram calculados a partir do gráfico do duplo – recíproco de acordo com o método de Lineweaver e Burk (PINTO e MENEZES, 2009).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Características do micro-organismo

O fungo *Aspergillus versicolor* em meio BDA apresenta crescimento micelial visível de cor branco algodão com 2 dias de crescimento e após 5 dias ocorre uma mudança na coloração de branco algodão para verde oliva no centro e branco nas bordas. Com 10 dias começa a apresentar coloração bege-rosada de textura coriácea, com reverso liso e produção de pigmentação de cor marron-vinho (Figura 1A e

B). As estruturas reprodutivas de *A. Versicolor* foram observadas com 10 dias de microcultivo, com auxílio de microscópio óptico na objetiva 100X, a estrutura reprodutiva apresenta conidióforo marrom brilhoso e vesículas radiadas (Figura 1C), de acordo com o descrito para o gênero (TEIXERA, et al., 2011).

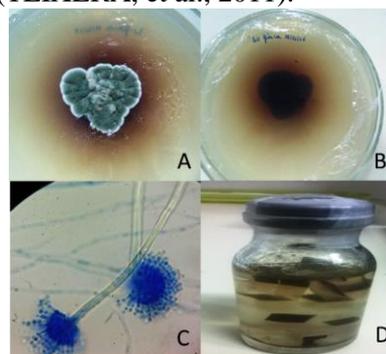


Figura 1- Aspectos macroscópicos e microscópicos de *A. Versicolor*, após 10 dias de crescimento em meio BDA (A) micélio característico, lado anterior da placa; (B) reverso da placa; (C) Estruturas reprodutivas em microcultivo de 10 dias, objetiva de 100x. (D) blocos de ágar com micélio de 10 dias preservados em água destilada esterilizada.

### 3.2 Perfil de Produção de $\beta$ -glucosidase por *A. versicolor* em meio líquido

A produção da enzima  $\beta$ -glucosidase por *A. versicolor* começou com baixa produção no período de 24h, porém, entre 48 e 72h houve um pico na produção da enzima que foi gradualmente aumentando até atingir atividade de 0,5237 U/mL no tempo de 120h (Figura 2), não tendo diferença estatística significativa entre a atividade observada no período de 96h e 120h ( $p>0,05$ ), assim o período considerado o de maior produção da enzima está entre 96 e 120, dessa forma, optou-se por fazer a indução direta no até o tempo de 120 horas.

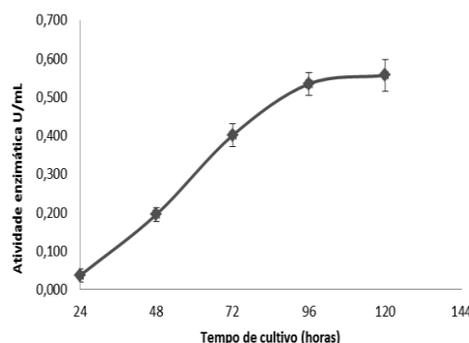


Figura 2- Perfil cinético da produção de  $\beta$ -glucosidase no sobrenadante de cultivo de *A. versicolor*. Os valores representam média e os desvios-padrão (N = 3).

Esse resultado corrobora com o descrito para outros fungos do mesmo gênero, que obtiveram níveis mais altos de produção de  $\beta$ -glucosidase posteriores a 72 horas de cultivo como *Aspergillus niger* (QIAN et al., 2012) e outros fungos filamentosos bons produtores de  $\beta$ -glucosidase, como *Fusarium oxysporum* (96h) (OLAJUYIGBE et al., 2016) e *Gongronella butleri* com períodos máximos de produção em 96 e 120h (BABU et al., 2015).

### 3.3 Determinação do pH ótimo

A atividade  $\beta$ -glucosidase foi mais alta na faixa de pH's 4.6, 5.0, 5.4 e 6.0 (Figura 3), evidenciando que a enzima  $\beta$ -glucosidase produzida pelo *A. versicolor* possui melhor atividade em pH's próximo à faixa ácida. Resultados similar ao reportado para várias estirpes de *Aspergillus niger* que apresentaram pH ótimo para atividade  $\beta$ -glucosidase entre 4.0 e 5.0 (ELSHAFEI et al., 2011;), enquanto que *Aspergillus glaucus* apresenta pH ótimo mais ácido, 3.6 (YAN et al., 1997).

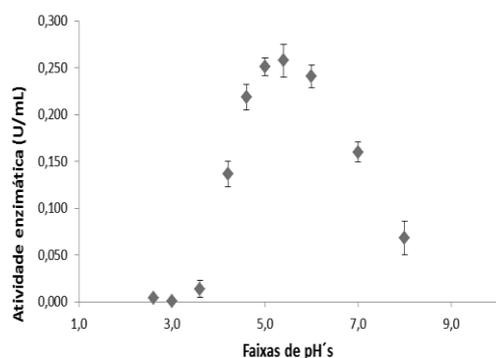


Figura 3 – Atividade  $\beta$ -glucosidásica no extrato enzimático de *A. versicolor* em diferentes faixas de pH's. Valores referentes às médias de réplicas biológicas e triplicatas amostrais. (N=9).

As enzimas são proteínas que contém vários resíduos de aminoácidos e a interação entre esses resíduos de aminoácidos e o substrato influencia o processo catalítico. Ao utilizarmos faixas de pH diferentes, a enzima muda sua conformação, tornando-se mais suscetível a ligação com o substrato, conferindo atividade ao local ativo,

enquanto a dissociação de outros grupos pode dificultar a atividade da enzima (BERGAMASSO e ZANIN, 2000). Por isso as enzimas só são ativadas em uma faixa restrita de pH, onde se tem a melhor atividade enzimática (DIXON e WEBB, 1979).

### 3.4 Determinação da temperatura ótima

A atividade enzimática  $\beta$ -glucosidásica presente no extrato enzimático de *A. versicolor* se mostrou baixa em temperaturas mais amenas como 20 e 30°C. Em 40°C e pH 6.0 chegou a atingir 0,169 U/mL de atividade enzimática. Sendo que na temperatura de 50°C o melhor pH foi o pH 5, com atividade de 0,254 U/mL. Porém onde se obteve uma atividade enzimática mais elevada foi na temperatura de 70°C, nos pH's 5.4 e 6.0 (figura 4.) No entanto não houve diferença estatística significativa entre as temperaturas 60 e 70 graus (ANOVA, Tukey, P>0.05), para os pH's também não houve diferença significativa entre os pH's 5.0, 5.4 e 6.0 nas temperaturas testadas (Tukey, p>0.05).

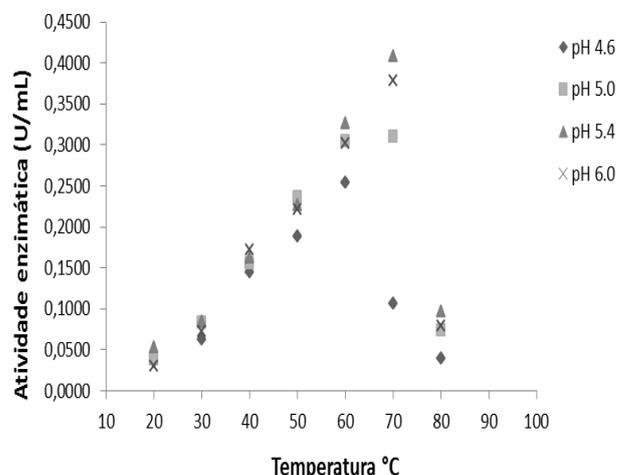


Figura 4 – Efeito da temperatura na atividade  $\beta$ -glucosidase. Valores referentes às médias de réplicas biológicas e triplicatas amostrais (N=9).

Desta forma determinou-se que a enzima  $\beta$ -glucosidase de *A. versicolor* apresenta atividades mais altas em 60 e 70°C e em pH's na faixa de 5.0 a 6.0. A temperatura ótima para celulases de fungos filamentosos de uma forma geral está em torno de 30° a 55 °C (XU et al., 2006). Porém os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com observado para as  $\beta$ -glucosidasas de outros *Aspergillus*, que

apresentaram atividade ótima entre 60 e 70 (DEKKER et al. 1986, ELSHAFEI et al., 2011)

### 3.5 Determinação da estabilidade térmica

Quanto à estabilidade térmica da atividade  $\beta$ -glucosidase, observou-se que a partir de 15 minutos de pré-incubação na temperatura de 50°C houve uma pequena queda na atividade que foi gradativa até 45 min, e estabilizou após 60 min, sem perdas relevantes a partir daí a enzima chegou em 120 minutos de pré-incubação com 67% de sua atividade relativa (Figura 5), a estabilidade da  $\beta$ -glucosidase de *Aspergillus versicolor* avaliada neste trabalho mostrou maior do que o descrito para *Aspergillus niger* nesta mesma temperatura que após 20min perdeu quase que 100% da atividade (JUNIOR et al., 2014). Na temperatura de 60°C a enzima apresentou-se estável após 15min de pré-incubação com atividade relativa de 96% (Figura 6), após 60min manteve a 68% e ao final de 120 minutos a enzima possuía uma atividade relativa de 50%. Na avaliação da estabilidade térmica de uma  $\beta$ -glucosidase produzida por *Aspergillus*-SA-58 isolado de ambiente marinho, detectou-se que a enzima em 60°C perdeu cerca de 56% de sua atividade após 1 hora de incubação (ELYAS et al., 2010).

Em 70°C obteve-se uma maior atividade enzimática, porém essa temperatura não foi favorável para a manutenção da atividade da enzima que após os primeiros 15 minutos de pré-incubação, ficou com apenas 18% de sua atividade relativa em relação à enzima que não foi pré-incubada (Figura 7). Além disso, a enzima perdeu toda sua atividade após 45 min de pré-incubação. A perda de estabilidade da enzima  $\beta$ -glucosidase em temperaturas mais altas também foi reportado para o fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* que foi estável até 60°C perdendo totalmente a atividade em 70°C (Silva et al., 2016), e *Aspergillus fumigatus* Z5 apresentou perda na atividade  $\beta$ -glucosidase de 50% a 70°C, e perdeu a atividade quando pré-incubada em 80°.

Visto que a temperatura de 70°C ocasionou desestabilidade na atividade enzimática, embora tenha proporcionado uma atividade alta, ela foi excluída dos próximos experimentos, pois a estabilidade da enzima em uma determinada temperatura é crucial para estabelecer sua

eficiência. Sendo assim, para os ensaios seguintes foi utilizado a segunda melhor temperatura avaliada (60°C) em pH 6.0, uma vez que a avaliação estatística mostrou não haver diferença significativa (ANOVA, Tukey,  $p > 0,05$ ) entre as temperaturas 60 e 70°C e nem entre os pH's 5.4 e 6.0 em 60°C.

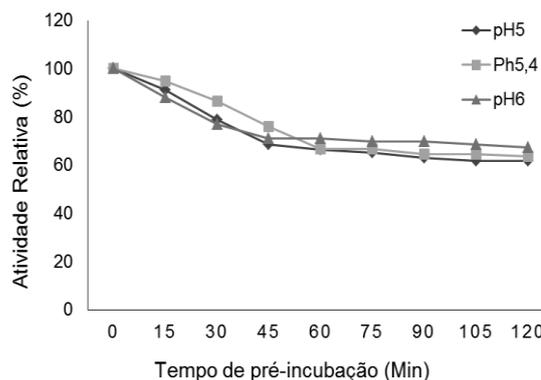


Figura 5 – Estabilidade térmica da atividade enzimática na temperatura de 50°C e pH's 5.0, 5.4 e 6.0.

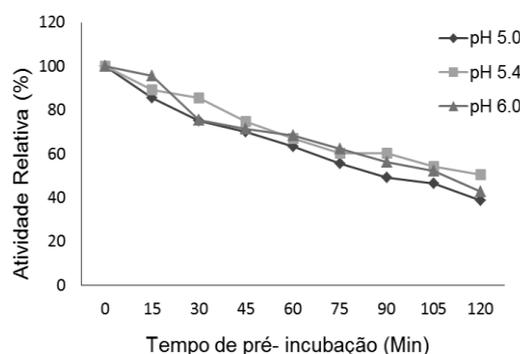


Figura 6 – Estabilidade térmica da atividade enzimática na temperatura de 60°C e pH's 5.0, 5.4 e 6.0.

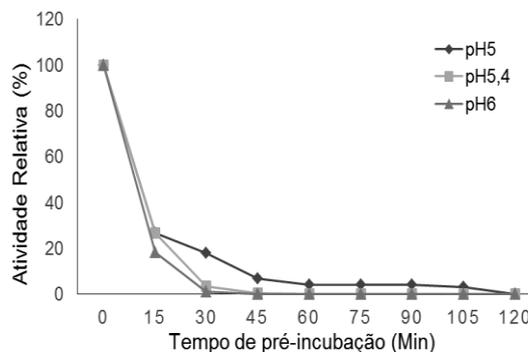


Figura 7 – Estabilidade térmica da atividade enzimática na temperatura de 70°C e pH's 5.0, 5.4 e 6.0.

### 3.6 Efeito de íons metais

Estudos que envolvem o efeito de íons metais sobre a atividade de uma determinada enzima são

importantes para se verificar o grau de interação inibitória ou potencializadora que esta enzima sofre ao entrar em contato com tais íons, tendo em vista que a mesma poderá entrar em contato com estes íons metais em algum processo industrial onde ela poderá ser aplicada, podendo assim ser inibida completamente, não sendo viável para certos processos.

Dos íons metais testados, o NaCl e o CaCl<sub>2</sub> inibiram apenas 5,8 e 5% da atividade enzimática, respectivamente. Enquanto que o MgCl<sub>2</sub> e o ZnSO<sub>4</sub> tiveram efeito positivo na atividade de β-glucosidase em 1,5% e 9%. Para β-glucosidases de *Aspergillus niger* o ZnSO<sub>4</sub> ocasionou uma perda de 34,4% da atividade relativa (AHMED et al. 2015) O único íon que inibiu 100% a atividade da enzima de *Aspergillus versicolor* no presente estudo foi o CuSO<sub>4</sub>. Já em alguns fungos o efeito do CuSO<sub>4</sub> apresentou efeito diferente, como por exemplo, β-glucosidases produzidas por uma linhagem mutante de *Neurospora crassa*, onde este íon teve efeito positivo de ativar a atividade enzimática (YAZDI et al., 2003), esse fato demonstra que os íons metais agem de forma diferente sobre cada enzima, podendo agir como inibitórios ou estimulatórios dependendo da enzima estudada (DAIROT, 2007).

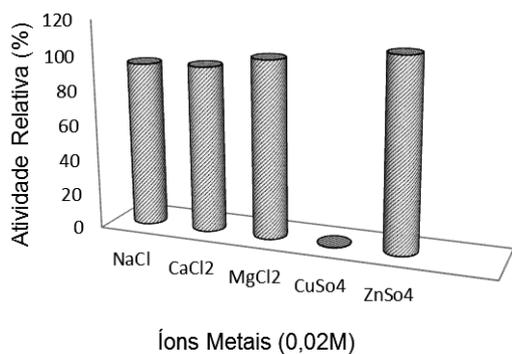


Figura 8– Efeito de íons metais sobre a atividade β-glucosidase de *A. versicolor*.

### 3.7 Determinação dos parâmetros cinéticos

#### *K<sub>m</sub>* e *V<sub>máx</sub>*

A atividade β-glucosidásica nas diferentes concentrações (mM) do substrato celobiose foi avaliada nas condições ótimas estabelecidas (temperatura 60°C e pH 6.0). A velocidade é dada em termos de μmol de produto feito, por minuto, como a atividade enzimática (é dada por 1 Unidade de enzima equivale a 1μmol de produto liberado por minuto) (PINTO e MENEZES,

2009), os valores das atividades enzimáticas dosadas foram utilizados para determinar o 1/V<sub>0</sub>, e os valores das diferentes concentrações de celobiose (mM) foram utilizados para determinação de 1/[S]. A partir da plotagem destes dados construiu-se o gráfico do duplo-recíproco (*Lineweaver – Burk*) mostrado na figura 9.

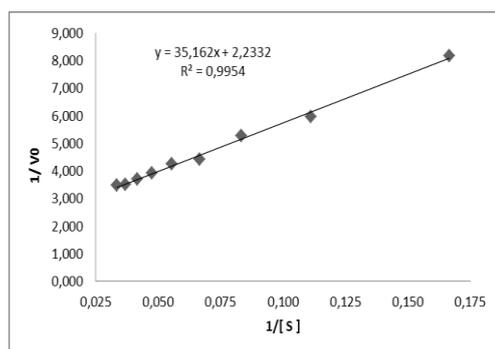


Figura 9 – Duplo-recíproco, construído a partir da variação do substrato celobiose, em relação à velocidade inicial.

Através da equação de *Lineweaver – Burk* o valor de *K<sub>m</sub>* e *V<sub>máx</sub>* foram calculados substituindo-se os valores da equação do duplo recíproco gerada.

Equação gerada:

$$y = 35,162x + 2,2332$$

Equação de *Lineweaver – Burk*:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Sendo:  $y = ax + b$ , e  $y = 1/V_0$ ;

$a = K_m/V_{máx}$ ;  $b = 1/V_{máx}$  e  $x = 1/[S]$ .

Logo,  $K_m = 15,62\mu\text{M}$  e  $V_{máx} = 0,448\mu\text{M}$ .

As constantes de *K<sub>m</sub>* e *V<sub>máx</sub>* variam de acordo com as metodologias utilizadas, e quanto menor for o valor do *K<sub>m</sub>* maior é sua eficiência catalítica (CASTRO e PEREIRA Jr, 2010), portanto a β-glucosidase de *A. versicolor*, pode ser considerada uma enzima com eficiente desempenho catalítico.

### 4. Conclusão

O fungo *Aspergillus versicolor* se mostrou um bom produtor de β-glucosidases em meio de cultivo submerso, tendo como fonte de carbono indutora de produção enzimática, a celulose



**PIBIT/2016-2017 – Universidade Federal do Amazonas**

microcristalina. Além disso, os parâmetros avaliados indicam que esta enzima tem sua atividade ótima em pH 6.0 e temperatura 60°C, sendo relativamente estável na sua temperatura ótima, e ainda é altamente estável na temperatura de 50°C, a temperatura padrão para atividade em conjunto com celulases. Os dados obtidos nesse trabalho são interessantes pois indicam o potencial da enzima produzida por esta estirpe para aplicação industrial, entretanto mais pesquisas voltadas pra otimização, por exemplo, podem ser realizadas a fim de tornar esse processo ainda mais eficiente.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Federal do Amazonas, pela formação. Ao Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas, pela concessão do espaço e uso dos laboratórios. Ao Programa Institucional de Bolsas de Desenvolvimento Tecnológico-PIBITI, pela oportunidade de desenvolver um projeto de iniciação tecnológica. À profa. Dra. Sônia Maria de Carvalho, pela identificação morfológica do fungo estudado. A todos os integrantes do grupo de pesquisa de Microbiologia de Insetos e Biotecnologia, pelo apoio concedido e parceria nas discussões científicas durante o desenvolvimento desse projeto.

### Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

### Referências

AHAMED, A., VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochem. Eng. J.**, 40, 399–407, (2008).

ALFENAS, A.C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. 382 p. Editora UFV, Viçosa, 2007.

AMOREA, A., FARACO, V. Potential of fungi as category I Consolidated BioProcessing organisms for

cellulosic ethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 16. 3286-3301, 2012, <[doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.050](http://doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.050)>.

BHIRI, F., CHAABOUNI, S. E., LIMAM, F., GHRIR, R. NEJIB MARZOUKI. Purification and Biochemical Characterization of Extracellular  $\beta$ -Glucosidases from the Hypercellulolytic Pol6 Mutant of *Penicillium occitanis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 149. 169-182, 2008, <[doi.org/10.1007/s12010-008-8146-y](http://doi.org/10.1007/s12010-008-8146-y)>.

BUSTO, M.D., ORTEGA, PEREZ-MATEOS, N., M., Induction of  $\beta$ -glucosidase in fungal and soil bacterial cultures, In Soil. **Biology and Biochemistry**, 1995, <[doi.org/10.1016/0038-0717](http://doi.org/10.1016/0038-0717)>.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 42, 225-226, 1939.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Jr. Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais. **Química Nova**, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010, <[doi.org/10.1590/S0100-40422010000100031](http://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100031)>.

COULON, S., CHEMARIN, P., GUEGUEN, Y., ARNAUD, A. Purification and characterization of an intracellular beta-glucosidase from *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Vol.74, Issue 2, pp 105–114, 1998.

DEKKER, R. F. H. Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial beta -d-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose, **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 28, no. 9, pp. 1438–1442, 1986

DEVAUX, M. F., TARALOVA, I., LEVY-VEHEL, J., BONNIN, E., THIBAUT, J. F., GUILLON, F. Contribution of image analysis to the description of enzymatic degradation kinetics for particulate food material. **Journal of Food Engineering**, 77, 1096 1107, 2006, <[doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.046](http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.046)>.

DOUGHERTY, M., J., D'HAESELEER, P., HAZEN, C., J., SIMMONS, B., A., ADAMS, P., D., HADI, M. Glycoside Hydrolases from a targeted compost metagenome, activityscreening and functional characterization. **BMC Biotechnology**, 2005, <[doi.org/10.1186/1472-6750-12-38](http://doi.org/10.1186/1472-6750-12-38)>.

DOUGHERTY, M.J.; D'HAESELEER, P., HAZEN, T. C SIMMONS, B. A., ADAMS, P. D., HAD, M. Z. Glycoside Hydrolases from a targeted Compost Metagenome, activity-screening and functional characterization. **BMC Biotechnology**, 2012, <[doi.org/10.1186/1472-6750-12-38](http://doi.org/10.1186/1472-6750-12-38)>.



**PIBIT/2016-2017 – Universidade Federal do Amazonas**

- ELSHAFEI, A. M., HASSA, M. M., MORSI, N. M. Morsi, and D. H. Elghonamy. Purification and some kinetic properties of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus terreus* NRRL 265, **African Journal of Biotechnology**, vol. 10, no. 84, pp. 19556–19569, 2011.
- GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure & Appl. Chem.**, 59(2), 257–268, 1987.
- GOMATHI, D., MUTHULAKSHMI, C., KUMAR, D.G., RAVIKUMAR, G., KALAISELVI, M., UMA, C. Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulase, **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, V. 2, Issue 1, Supplement, January 2012, <doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60132-4>.
- JUNIOR, A. B. D. G., BORGES P. W. FARINAS, T., FARINAS, C. Characterization of  $\beta$ -Glucosidase Produced by *Aspergillus niger* under Solid-State Fermentation and Partially Purified Using MANAE-Agarose, **Biotechnology Research International**, vol. 2014, Article ID 317092, 8 pages, 2014. doi:10.1155/2014/317092.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W.H.V.; PRETORIUS, I.S.; Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 66, p.506, 2002.
- MANDELS, M. and WEBER, J. The production of cellulases. In: Cellulases and Their Applications, Advances in Chemistry Series. **American Chemical Society**, vol. 95, chapter 23, p. 391-414, 1969.
- MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **J. Biol. Chem.**, v. 49, p. 83-186, 1921, <<http://www.jbc.org/content/49/1/183>>.
- NIGAM, P. S. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications, **Biomolecules**, vol. 3, 597-611; 2013, <doi:10.3390/biom3030597>.
- PINTO, G. F., MENEZES, R. R. **Cinética Enzimática**. E-papers, 320p. Rio de Janeiro, 2009.
- R. M. VAN, DER KAAIJ, X.-L. YUAN, A. FRANKEN, A. F. J. RAM, P. J. PUNT, M. J. E. C. van der Maarel, and L. Dijkhuizen. Two Novel, Putatively Cell Wall-Associated and Glycosylphosphatidylinositol-Anchored  $\alpha$ -Glucanotransferase Enzymes of *Aspergillus niger*. **American Society for Microbiology**, 2007.
- SHI Q., SUN J., YU H.L., LI C.X., BAO J., XU J.H. Catalytic performance of corn stover hydrolysis by a new isolate *Penicillium sp.* ECU0913 producing both cellulase and xylanase. **Appl Biochem Biotechnol**. 2011.
- SILVA, V. C. T., COTO, A. L. S., SOUZA, R. C., Neves, M. B. S., Gomes, E., Rodriguez, G. O. B. Effect of pH, Temperature, and Chemicals on the Endoglucanases and  $\beta$ -Glucosidases from the Thermophilic Fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Obtained by Solid-State and Submerged Cultivation, **Biochemistry Research International**, 2016, <doi:10.1155/2016/9781216>.
- SINGHANIA, R.R., PATEL A.K., SUKUMARAN R.K., LARROCHE, C., PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresour Technol**, 2013< doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.012>.
- TEIXEIRA, M. F.S., SILVA, T. A., PALHETA, R. A., CARNEIRO, A. L.B., ATAYDE, H.M. **Fungos da Amazônia: Uma Riqueza Inexplorada**. Manaus: Edua, 2011. 255p.
- TOLAN, J.S. Iogen's process for producing ethanol from cellulosic biomass. **Clean Techn Environ Policy**. v.3, p.339–45, 2002.
- WARD, O. P., QIN, W. M., DHANJOON, J., YE, J., & SINGH, A. **Physiology and Biotechnology of Aspergillus**. (Vol. 58, pp. 1–75), 2005, <doi.org/10.1016/S0065-2164(05)58001-8>.
- XU, Q., ADNEY, W. S., DING, S.-Y., MICHAEL, H. E. **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**. In J. Polaina & A. P. MacCabe (Eds.) (pp. 35–50), 2007, Dordrecht: Springer Netherlands. <doi.org/10.1007/1-4020-5377-0\_3>.
- XU, Q.; ADNEY, W.S.; DING, S.Y.; HIMMEL, M. E. Cellulases For Biomass Conversion. In: POLAINA J.; MacCabe A.P. (Eds.). **Industrial Enzymes**, 35–50, 2007.
- YAN, T.R., LIN, C.L. Purification and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, vol. 61, no. 6, pp. 965–970, 1997.
- ZHANG, Y.H. P., HONG, J., YE, X. Cellulase Assays. **Methods in Molecular Biology**. 581:213–231, 2009.